

**PCT**WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup> : <b>A61R 31/495, 31/445, 31/195, C07D 295/182, A61R 47/48</b>		<b>A2</b>	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: <b>WO 00/04954</b>  (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: <b>3. Februar 2000 (03.02.00)</b>
(21) Internationales Aktenzeichen: <b>PCT/EP99/05145</b>  (22) Internationales Anmeldedatum: <b>20. Juli 1999 (20.07.99)</b>  (30) Prioritätsdaten: <b>98113519.7</b> <b>20. Juli 1998 (20.07.98)</b> <b>EP</b>  (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): <b>WILEX BIOTECHNOLOGY GMBH [DE/DE]; Grillparzer Strasse 10 B, D-81675 München (DE).</b>  (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): <b>WILHELM, Olaf [DE/DE]; Säbener Strasse 188, D-81545 München (DE). MAG-DOLEN, Viktor [US/DE]; Moosacherweg 3, D-85551 Kirchheim (DE). STÜRZBECHER, Jörg [DE/DE]; Hubertusstrasse 38, D-99094 Erfurt (DE). FOEKENS, John [NL/NL]; Filosofentuin 35, NL-2908 XA Capelle a/d IJssel (NL). LUTZ, Verena [DE/DE]; Sankt-Wolfgangs-Platz 9F, D-81669 München (DE).</b>  (74) Anwälte: <b>WEICKMANN, H. usw.; Kopernikusstrasse 9, D-81679 München (DE).</b>		(81) Bestimmungsstaaten: <b>AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</b>  <b>Veröffentlicht</b> <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>	
(54) Title: <b>NOVEL UROKINASE INHIBITORS</b>  (54) Bezeichnung: <b>NEUE UROKINASE-INHIBITOREN</b>  (57) Abstract  The invention relates to the use of derivatives of 3-amidino-phenyl-alanine as urokinase inhibitors for treating malignant tumors and the formation of metastases thereof.  (57) Zusammenfassung  Die Erfindung betrifft die Verwendung von Derivaten des 3-Amidino-phenylalanins als Urokinase-Inhibitoren zur Behandlung von malignen Tumoren und der Metastasierung.			

# **LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshon	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauritanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

## Neue Urokinase-Inhibitoren

### Beschreibung

5

Die Erfindung betrifft die Verwendung von Derivaten des 3-Amidino-phenylalanins als Urokinase-Inhibitoren insbesondere zur Behandlung von malignen Tumoren und der Metastasierung bzw. als Mittel zum Targeting von Lymphzellen und zur Behandlung von Erkrankungen des Lymphgewebes, insbesondere von Lymphomen.

10

Die Fähigkeit solider Tumoren zur Ausbreitung und Metastasierung in umgebendes Gewebe korreliert mit dem Abbau bzw. Umbau der extrazellulären Matrix (Tumorstroma) in der Umgebung der Tumorzelle, bzw. mit deren Fähigkeit zur Durchdringung der Basalmembran. Obwohl die (patho)biochemischen Zusammenhänge noch nicht endgültig aufgeklärt sind, kommen dem Plasminogenaktivator Urokinase (uPA) und dem Urokinaserezeptor (uPAR) eine zentrale Bedeutung zu. uPA vermittelt die proteolytische Spaltung von Plasminogen zu Plasmin. Plasmin wiederum ist eine Protease mit breitem Wirkspektrum, die Komponenten der extrazellulären Matrix wie Fibrin, Fibronectin, Laminin und das Proteingerüst der Proteoglykane direkt abzubauen vermag. Außerdem kann Plasmin "latente" Metalloproteasen und das inaktive Proenzym von uPA, pro-uPA, aktivieren.

20

Tumorzellen und nichtmaligne Zellen des Tumorstromas synthetisieren und sezernieren das enzymatisch inaktive Proenzym pro-uPA. Proteasen wie z.B. Plasmin oder die Kathepsine B und L spalten pro-uPA durch limitierte Proteolyse zur aktiven Serinprotease HMW-uPA (HMW = high molecular weight). pro-uPA und die aktive Protease HMW-uPA binden an den Zelloberflächenrezeptor uPAR (CD87). Plasmin(ogen) bindet ebenfalls an spezifische Rezeptoren auf der Plasmamembran der Tumorzelle, wodurch eine Fokussierung und Amplifikation der Plasminogenaktivierung in der direkten Umgebung der

30

- 2 -

Tumorzelle erreicht wird. Invasiven Zellen ist somit die Möglichkeit gegeben, die extrazelluläre Matrix abzubauen, ohne sich der für eine gerichtete Bewegung notwendigen Unterlagen durch Proteolyse zu entziehen.

5 In verschiedenen zellbiologischen Studien konnte gezeigt werden, daß dem zellassoziierten Plasminogenaktivator-System innerhalb der kaskadenartigen Reaktionswege tumorassoziiierter Proteolyseysteme ein besonderer Stellenwert zukommt (Wilhelm et al. (1994) The Urokinase/Urokinase receptor system: A new target for cancer therapy? In: Schmitt M., Graeff H.,  
10 Kindermann G. (Hrsg): Prospects in Diagnosis and Treatment of Cancer. International Congress Series, Excerpta Medica 1050, Amsterdam, Elsevier 1994, pp145-156). An Kulturen humaner Kolonkarzinomzellen wurde beobachtet, daß deren Fähigkeit, eine extrazelluläre Matrix zu durchwandern, vom Sättigungsgrad der uPA-Rezeptoren mit aktivem uPA  
15 abhängig ist (Hollas et al., Cancer Res. 51 (1991), 3690-3695). Ebenfalls im Zellkulturmodell wurde eine Reduktion des invasiven Potentials von Zellen beobachtet, wenn die proteolytische Aktivität von uPA durch PAI-1 (Cajot et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87 (1990), 6939-6943) oder PAI-2 (Baker et al., Cancer Res. 50 (1990), 4676-4684) gehemmt wurde. Ein  
20 vergleichbarer Effekt wurde bei Hemmung der Bindung von uPA an die Zelloberfläche durch Blockierung des Rezeptors mittels proteolytisch inaktiver uPA-Varianten erzielt (Cohen et al., Blood 78 (1991), 479-487; Kobayashi et al., Br. J. Cancer 67 (1993), 537-544). Auch die Transfektion epidermoider Karzinomzellen mit einem Plasmid, das ein Antisense-  
25 Transkript gegen einen Teil von uPAR exprimiert, führte durch Unterdrückung der uPAR-Synthese zur Verringerung der Invasivität dieser Zellen (Kook, EMBO J. 13 (1994), 3983-3991). Gegen uPA und PAI-1 gerichtete Antikörper reduzierten das invasive Potential von Lungenkrebszellen in vitro (Liu et al., Int. J. Cancer 60 (1995), 501-506).

30

Der Einfluß des Plasminogenaktivator-Systems auf den Metastasierungsprozeß konnte auch in Tumor-Tiermodellen belegt werden. So wurden die

- 3 -

durch menschliche Karzinomzellen verursachte Bildung von Lungenmetastasen in Hühnerembryos durch Zugabe von Antikörpern gegen uPA fast vollständig verhindert (Ossowski und Reich, *Cell* 35 (1983), 611-619). Metastasierende menschliche Karzinomzellen wurden mit einem Ex-  
5 pressionsplasmid transfiziert, das für eine proteolytisch inaktive, aber uPAR-bindende uPA-Mutante kodierte. Im Mausmodell zeigte sich, daß die Karzinomzellen, die inaktives uPA synthetisierten, nach Injektion im Vergleich zu den nichttransfizierten Zellen eine signifikant geringere Anzahl an Metasta-  
10 5025). Nach Verabreichung von uPA-Antisense Oligonukleotiden wurde darüber hinaus eine Inhibierung der intraperitonealen Ausbreitung von humanen Ovarialkarzinomzellen in Nacktmäusen beobachtet (Wilhelm et al., *Clin. Exp. Metast.* 13 (1995), 296-302).

15 In den letzten Jahren wurde die klinische Relevanz von Faktoren des Plasminogenaktivator-Systems (uPA, uPAR, PAI-1 und PAI-2) für die Prognose von Patienten mit soliden malignen Tumoren intensiv untersucht. Dabei erwies sich der uPA-Antigengehalt bei verschiedenen Tumoren (z.B. Brust, Eierstock, Magen, Lunge, Niere etc.) sowohl für das rezidivfreie Überleben  
20 als auch für das Versterben als ein starker Prognosefaktor (siehe beispielsweise Schmitt et al., *J. Obstet. Gynaecol.* 21 (1995), 151-165; Jaenicke et al., *Breast Cancer Res. Treat.* 24 (1993), 195-208; Kuhn et al., *Gynecol. Oncol.* 55 (1994), 401-409; Nekarda et al., *Lancet* 343 (1994), 117; Pedersen et al., *Cancer Res.* 54 (1994), 4671-4675). Ebenso korrelieren erhöhte Konzentrationen an uPAR in Lungen- (Pedersen et al., *supra*) und  
25 Brustkrebsgewebe (Duggan et al., *Int. J. Cancer* 61 (1995), 597-600; Ronne et al., *Breast Cancer Res. Treat.* 33 (1995), 199-207) sowie bei Magenkrebs sowohl im Tumorgewebe selbst (Heiss et al., *J. Clin. Oncol.* 13 (1995), 2084-2093) als auch bei den ins Knochenmark ausgestreuten  
30 Tumorzellen (Heiss et al., *Nature Medicine* 1 (1995), 1035-1039) mit einer schlechten Prognose.

- 4 -

Der Einsatz von synthetischen uPA-Inhibitoren bietet die Möglichkeit, die Invasion und Ausbreitung von Tumorzellen zu unterdrücken. Allerdings ist die Entwicklung spezifischer uPA-Inhibitoren mit Schwierigkeiten behaftet, da der Plasminogenaktivator von Gewebetyp (tPA) eine identische Spezifität für die Spaltung der Peptidbindung Arg560/Val561 von Plasminogen aufweist. In den meisten Fällen hemmen daher niedermolekulare uPA-Inhibitoren auch tPA und damit auch tPA-vermittelte Fibrinolyse. Außerdem muß gewährleistet sein, daß synthetische uPA Inhibitoren keine starke Hemmung von Plasmin zeigen.

Trotz dieser Einschränkungen sind einige Hemmstoffe bekannt, die eine gewisse Spezifität gegenüber uPA, jedoch geringe inhibitorische Kapazität besitzen, wie etwa Benzamidin- und  $\beta$ -Naphthamidin-Derivate, wobei die wirksamste Verbindung uPA mit  $K_i = 2,2 \mu\text{mol/l}$  hemmt (Stürzebecher und Markwardt, Pharmazie 33 (1978), 599), oder Amilorid mit einem  $K_i = 7 \mu\text{mol/l}$  (Vassalli und Belin, FEBS. Lett. 214 (1987), 187-191).

DE-A-30 35 086 offenbart Cyclohexancarbonsäurederivate, die inhibitorische Wirkungen auf Proteasen wie Trypsin, Chymotrypsin, Thrombin oder uPA haben. Die untersuchten Verbindungen zeigen jedoch nur eine recht geringe und darüber hinaus unspezifische uPA-Inhibierung. EP-A-O 183 271 offenbart Lysinderivate und deren Verwendung als Proteaseinhibitoren. Es wird auch ein Benzamidino-Lysinderivat (Verbindung 108) beschrieben, das in vitro eine uPA-Hemmung, jedoch auch eine vergleichbare Wirkung auf andere Proteasen wie Trypsin oder Plasma-Kallikrein aufweist. WO 95/17885 offenbart niedermolekulare Polypeptide als uPA-Inhibitoren.

Eine weitere Klasse von bekannten uPA-Inhibitoren stellen 4-substituierte Benzothiophen-2-carboxamide mit einem  $K_i = 0,16 \text{ mmol/l}$  im Falle von Benzothiophen-623 dar (Towle et al., Cancer Res. 53 (1993), 2553-2559). Diese Hemmstoffe haben eine signifikant höhere Affinität für uPA im Vergleich zu tPA und Plasmin. Auch uPAR-gebundenes uPA wird mit hoher

- 5 -

Effizienz gehemmt. Ein Nachteil dieser Substanzen liegt allerdings darin, daß die chemische Synthese kompliziert ist und kaum Möglichkeiten für die Modifizierung der Struktur vorhanden sind, bzw. bisher gezeigt werden konnte.

- 5 Die Entwicklung weiterer Hemmstoffe von uPA ist daher für die weitere Aufklärung der Rolle von uPA und uPAR bei verschiedenen Krankheiten, speziell bei der Tumorausbreitung und Metastasierung, von großem Nutzen.

10  $\alpha$ -Arylsulfonyl- und  $\alpha$ -Arylsulfonyl-amino-acyl-Derivate des 3-Amidinophenylalanins sind als selektive Hemmstoffe von Thrombin (Markwardt et al., Thromb. Res. 17 (1980), 425-431) bzw. von Gerinnungsfaktor Xa (Stürzebecher et al., Thromb. Res. 54 (1989), 245-252) bekannt. Auch in WO 92/08709, WO 94/18185 und WO 96/05189 wird die Verwendung von Amidinophenylalaninderivaten als Hemmstoffe für die Blutgerinnung, 15 insbesondere als Hemmstoffe für Thrombin, offenbart.

Intensiv wurden Piperidide und Piperazide des 3-Amidinophenylalanins untersucht, unter denen auch Leitstrukturen zur Hemmung fibrinolytischer Enzyme gefunden wurden (Stürzebecher et al., J. Enzyme Inhibition 9,87-99, 1995; Stürzebecher et al., J. Med. Chem. 40, 3091-3099, 1997). 20 Während bei Stürzebecher et al. (1995) nur eine Hemmung von Thrombin, Faktor Xa, Plasmin und Trypsin beschrieben ist, finden sich bei Stürzebecher et al. (1997) auch Angaben zur Hemmung von uPA. Bei  $\alpha$ -2-Naphthylsulfonyl-,  $\alpha$ -2-(2,2,5,7,8-Pentamethylchroman-6-yl)sulfonyl- und 25  $\alpha$ -2-Campher-10-yl-sulfonyl-substituierten 3-Amidinophenylalaninpipe-raziden wird für uPA ein  $K_i$ -Wert von 28 bis 140  $\mu\text{mol/l}$  gefunden, der um drei Größenordnungen höher als die Inhibitionskonstante für Thrombin ist. Somit konnte nicht davon ausgegangen werden, daß 3-Amidinophenylala- ninderivate als Urokinaseinhibitoren geeignet sind.

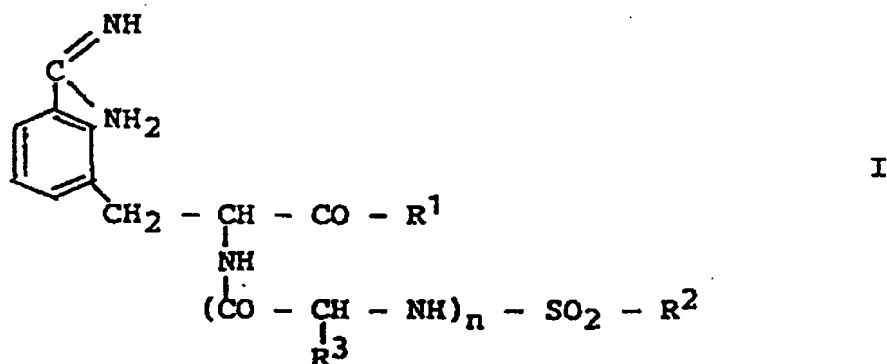
30

Überraschenderweise wurde jedoch gefunden, daß an Position 2 mit einem Phenylrest substituierte 3-Amidinophenylalaninderivate selektive und in vivo

- 6 -

wirksame Hemmstoffe von uPA darstellen. Weiterhin wurde gefunden, daß diese Substanzen eine hohe Selektivität für Lymphgewebe aufweisen und sich daher als Mittel zum Targeting von Lymphzellen, beispielsweise zur Behandlung von malignen Erkrankungen des Lymphgewebes wie etwa Lymphomen eignen.

Die vorliegende Erfindung betrifft von 3-Amidinphenylalanin abgeleitete neue Urokinase-Inhibitoren der allgemeinen Formel I,



die als Racemate sowie als L- bzw. D-konfigurierte Verbindungen vorliegen und in denen

R1 (a) OH oder OR<sup>4</sup> ist, wobei R<sup>4</sup> ein gegebenenfalls z.B. mit Hydroxyl, Carboxyl, Sulfonyl, Nitro, Cyano, Oxo oder/und Halogen substituiertes, verzweigtes oder unverzweigtes C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-Alkyl, C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>-Cycloalkyl oder Aralkyl, z.B. Benzyl oder Phenylethyl ist,

(b) eine Gruppe der Formel  $\begin{array}{c} \text{R}^5 \\ \diagup \\ \text{N} \\ \diagdown \\ \text{R}^6 \end{array}$  darstellt, in welcher R<sup>5</sup> und

R<sup>6</sup> beliebige mit der Gesamtstruktur kompatible Reste sind, wobei insbesondere

- (i) R<sup>5</sup> und R<sup>6</sup> H sind,
- (ii) R<sup>5</sup> H ist und R<sup>6</sup> ein gegebenenfalls z.B. mit Hydroxyl, Carboxyl, Sulfonyl, Nitro, Cyano, Oxo oder/und Halogen substituiertes verzweigtes oder unverzweigtes C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-

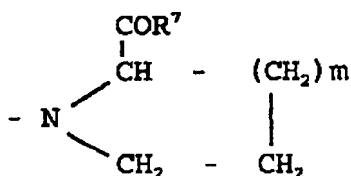


- 7 -

Alkyl, Aralkyl, z.B. Benzyl oder Phenylethyl, oder C<sub>5</sub>-C<sub>8</sub> Cycloalkyl ist,

- (iii) R<sup>5</sup> und R<sup>6</sup> jeweils unabhängig ein gegebenenfalls z.B. mit Hydroxyl oder/und Halogen substituiertes, unverzweigtes oder verzweigtes C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> Alkyl sind oder
- (iv) R<sup>5</sup> H ist und R<sup>6</sup> -NH<sub>2</sub> oder eine insbesondere mit Aryl oder Heteroaryl substituierte Aminogruppe ist,
- (v) R<sup>5</sup> H oder ein gegebenenfalls z.B. mit Hydroxyl oder/und Halogen substituiertes, unverzweigtes oder verzweigtes C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> Alkyl ist und R<sup>6</sup> der Rest einer Aminosäure, z.B. einer α-, β- oder ω-Aminocarbon- oder Aminosulfonsäure, oder der Rest eines Peptids z.B. mit einer Länge bis zu 50 Aminosäuren oder eines Polypeptids z.B. mit einer Länge von mehr als 50 Aminosäuren bis 1000 Aminosäuren ist,

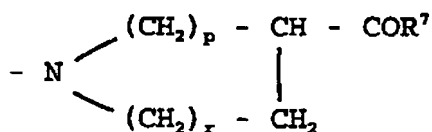
(c) eine Gruppe der Formel



darstellt, in welcher m die Zahl 1 oder 2 bezeichnet, und in welcher eine oder mehrere der Methylengruppen gegebenenfalls z.B. mit einem Hydroxyl-, Carboxyl-, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-Alkyl- oder Aralkylrest, z.B. Benzyl oder Phenylethyl, substituiert sind, wobei die Gruppe (c) racemisch oder D- bzw. L-konfiguriert ist, und R<sup>7</sup> die Bedeutung von R<sup>1</sup> in den Ziffern (a), (b) und (f) aufweist,

- 8 -

(d) eine Gruppe der Formel



darstellt, in welcher  $p = r = 1$ ,  $p = 1$  und  $r = 2$  oder  $p = 2$  und  $r = 1$  sind und in welcher eine oder mehrere der Methylengruppen gegebenenfalls z.B. mit einem Hydroxyl-, Carboxyl-,  $C_1$ - $C_4$ -Alkyl- oder Aralkylrest, z.B. Benzyl oder Phenylethyl, substituiert sind, und  $R^7$  die Bedeutung von  $R^1$  in Ziffer (a), (b) und (f) aufweist,

(e) eine Piperidylgruppe darstellt, die gegebenenfalls in einer der Stellungen 2, 3 und 4 z.B. mit einem  $C_1$ - $C_4$ -Alkyl-,  $C_1$ - $C_3$ -Alkoxy- oder Hydroxylrest substituiert ist, wobei gegebenenfalls an die heterocycloaliphatischen Ringe der Formeln (c), (d), (e) ein weiterer aromatischer oder cycloaliphatischer Ring, vorzugsweise Phenyl oder Cyclohexyl, in 2,3 oder 3,4 Stellung, bezogen auf das Heteroatom, ankondensiert ist,

(f) eine Gruppe der Formel



darstellt, in welcher  $R^8$

- (i) einen gegebenenfalls z.B. mit  $C_1$ - $C_6$ -Alkyl,  $C_1$ - $C_3$ -Alkoxy, Hydroxyl, Carboxyl, Sulfonyl, Nitro, Cyano, Oxo oder/und Halogen substituierten  $C_1$ - $C_6$ -Alkyl- oder Arylrest, wie z.B. Phenyl, p-Halogenphenyl, Naphthyl,
- (ii) einen gesättigten oder ungesättigten, verzweigten oder unverzweigten  $C_1$ - $C_6$ -Alkoxyrest oder

- 9 -

(iii) einen gegebenenfalls z.B. mit C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-Alkyl, C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>-Alkoxy, Hydroxyl, Carboxyl, Sulfonyl, Nitro, Cyano, Oxo oder/und Halogen substituierten Phenoxy- bzw. Benzylloxycarbonylrest bedeutet,

5

(g) einen Acylrest der Formel -COX darstellt, wobei X

(i) H, einen gegebenenfalls z.B. mit Hydroxyl, Carboxyl, Sulfonyl, Nitro, Cyano, Oxo oder/und Halogen substituierten, unverzweigten oder verzweigten Alkylrest, vorzugsweise einen C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-Alkylrest, insbesondere Methyl,

10

(ii) einen gegebenenfalls z.B. mit C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-Alkyl, C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>-Alkoxy, Hydroxyl, Carboxyl, Sulfonyl, Nitro, Cyano, Oxo oder/und Halogen substituierten Aryl- oder Heteroarylrest, wie z.B. Phenyl, p-Halogenphenyl, Thienyl oder

15

(iii) einen gegebenenfalls z.B. mit Hydroxyl, Carboxyl, Sulfonyl, Nitro, Cyano, Oxo oder/und Halogen substituierten Cycloalkylrest, vorzugsweise einen C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub>-Cycloalkylrest bedeutet,

20

(h) einen Aralkylrest, z.B. Benzyl oder Phenylethyl, darstellt, in dem der aromatische Rest gegebenenfalls z.B. mit einem Halogenatom, einer C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-Alkyl-, C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>-Alkoxy-, Hydroxy-, Cyano-, Carboxyl-, Sulfonyl- oder Nitrogruppe substituiert ist,

25

(i) einen Carbonsäureamidrest der Formel -CONR'R'', einen Thiocarbonsäureamidrest -CSNR'R'' oder einen Essigsäureamidrest -CH<sub>2</sub>-CONR'R'' darstellt, wobei

(i) R' und R'' H sind,

30

(ii) R' und R'' jeweils unabhängig C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-Alkyl sind,

(iii) R' H ist und R'' C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-Alkyl ist,

(iv) R' H ist und R'' Aryl, z.B. Phenyl, ist oder

- 10 -

(v) R' und R" mit dem Stickstoffatom einen heterocycloaliphatischen Ring mit 5-7 Ringgliedern, der ein weiteres Heteroatom z.B. N, O oder/und S tragen kann, bilden,

5 (j) einen SO<sub>2</sub>-Y-Rest darstellt, in dem Y

(i) ein gegebenenfalls z.B. mit Hydroxyl, Carboxyl, Sulfonyl, Nitro, Cyano, Oxo oder/und Halogen substituiertes C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-Alkyl, vorzugsweise Methyl, Trifluormethyl, Trichlormethyl,

10 (ii) ein gegebenenfalls z.B. mit C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-Alkyl, C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>-Alkoxy, Hydroxyl, Carboxyl, Sulfonyl, Nitro, Cyano, Oxo oder/und Halogen substituiertes Aryl oder Heteroaryl, wie z.B. Phenyl, 4-Methyl-phenyl, 2,4,6-Trimethyl-phenyl, 2,4,6-Triisopropyl-phenyl, 4-Methoxy-2,3,6-Trimethyl-phenyl, 2,2-Dimethyl-6-methoxy-chromanyl,  
15 2,2,5,7,8-Pentamethyl-chromanyl, Anthrachinonyl, Naphthyl oder Chinolyl, bzw. O-Aryl, vorzugsweise O-Phenyl, oder O-Heteroaryl oder

20 (iii) -NR'R" ist, wobei R' und R" jeweils unabhängig H oder C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>-Alkyl bedeuten,

(k) einen cycloaliphatischen Ring mit 5 bis 8 C-Atomen darstellt, der ggf. z.B. mit einer C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-Alkyl-, C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>-Alkoxy-, Halogen-, Hydroxyl- oder/und Oxogruppe substituiert ist,

25

(l) einen gegebenenfalls z.B. mit C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-Alkyl, C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>-Alkoxy, Hydroxyl, Carboxyl, Sulfonyl, Nitro, Cyano, Oxo oder/und Halogen substituierten Heteroarylrest, wie z.B. Pyridyl oder Pyrimidyl, oder heterocycloaliphatischen Rest, beispielsweise N-Methylpiperidyl darstellt,

30

- 11 -

(m) einen funktionalisierten Alkylrest der Formel  $-(CH_2)_n-X$  darstellt, wobei die Alkylkette unverzweigt oder verzweigt ist,  $n = 1$  bis 8 bedeutet und der funktionelle Rest X

(i) eine Hydroxylgruppe darstellt, deren H-Atom gegebenenfalls durch eine  $C_1-C_4$ -Alkyl-, Aralkyl-, z.B. Benzyl oder Phenylethyl, Aryl-, z.B. Phenyl,  $C_1-C_4$ -Hydroxyalkyl- oder Acylgruppe CO-Alkyl, ( $C_1-C_6$ ), substituiert ist,

(ii) ein Halogenatom bedeutet,

(iii) eine tertiäre Aminogruppe der Formel  $-N(Alk)_2$  darstellt, wobei die Alkylgruppen 1 bis 3 C-Atome sowie vorzugsweise die gleiche Bedeutung besitzen und das Stickstoffatom gegebenenfalls einem heterocycloaliphatischen Ring mit 5-7 Ringgliedern, der ein weiteres Heteroatom, z.B. N, O oder/und S tragen kann, angehört,

$R^2$  einen gegebenenfalls z.B. mit  $C_1-C_6$ -Alkyl,  $C_1-C_3$ -Alkoxy, Hydroxyl, Carboxyl, Sulfonyl, Nitro, Cyano, Oxo oder/und Halogen substituierten Phenylrest, wie beispielsweise Phenyl, 4-Methyl-phenyl, 2,4,6-Trimethyl-phenyl, 2,4,6-Triisopropyl-phenyl, 4-Methoxy-2,3,6-trimethyl-phenyl darstellt,

$R^3$  H oder verzweigtes bzw. unverzweigtes  $C_1-C_4$ -Alkyl ist und n 0 oder 1 bedeutet.

Die Verbindungen können auch als Salze vorzugsweise als physiologisch verträgliche Säuresalze, z.B. als Salze von Mineralsäuren, besonders bevorzugt als Hydrochloride, oder als Salze von geeigneten organischen Säuren vorliegen.

Von den in den allgemeinen Ansprüchen definierten Verbindungen sind solche, bei denen  $R^1$  einer Gruppe der Formeln (b), (d) und (f) entspricht,  $R^2$

- 12 -

einen einfach, zweifach oder dreifach alkylsubstituierten Phenylrest, insbesondere einen 2,4,6-substituierten Phenylrest, z.B. einen 2,4,6-Triisopropylphenyl-Rest darstellt und  $n = 0$  ist, von besonderer Bedeutung.

- 5 Die Verbindungen der allgemeinen Formel I können in prinzipiell bekannter Weise, wie z.B. in WO 92/08709 und WO 94/18185 beschrieben, hergestellt und auf ihre biologische in vitro Aktivität gesetzt werden.

(L)-, (D)- oder (D,L)-3-Cyanphenylalanin-methylester-hydrochlorid wird mit  
10 einem entsprechenden Sulfochlorid oder einer sulfonylierten Aminosäure bzw. deren Halogenid in Gegenwart einer Base zu einer Verbindung der allgemeinen Formel I mit Cyanfunktion, in der  $R^1 = OCH_3$  ist und  $R^2$  sowie  $R^3$  und  $n$  den in den allgemeinen Ansprüchen definierten Bedeutungen entspricht, umgesetzt. Durch milde saure oder alkalische Hydrolyse sind  
15 daraus die Verbindungen der allgemeinen Formel I mit Carbonsäurestruktur ( $R^1 = -OH$ ) erhältlich, deren Veresterung mit einem entsprechenden Alkohol unter säurekatalytischen Bedingungen zu Verbindungen der allgemeinen Formel I führt, wobei  $R^1 = (a)$  bedeutet. Nach einem in der Peptidchemie üblichen Verfahren, z.B. DCC-Verfahren in Gegenwart von HOBt, sind durch  
20 Umsetzung der Carbonsäuren der allgemeinen Formel I ( $R^1 = -OH$ ) mit einem Nukleophil der Strukturen (b), (e) und (f) die Verbindungen mit entsprechendem  $R^1$  der allgemeinen Formel I vorstellbar. Für die Synthese von Verbindungen mit  $R^1 = (c)$  und (d) werden zunächst die Carbonsäuren der allgemeinen Formel I mit  $R^1 = OH$  mit cycloaliphatischen Aminosäureestern der Strukturen (c) und (d), wobei  $R^7$  vorzugsweise  $-OCH_3$  bzw.  $-OC_2H_5$   
25 bedeutet, umgesetzt, die erhaltenen Carbonsäureester unter milden sauren oder alkalischen Bedingungen zu den entsprechenden Carbonsäuren hydrolysiert, die nachfolgend in bereits beschriebener Weise verestert oder mit Nukleophilen der Struktur (b), (e) und (f) umgesetzt werden können,  
30 wobei Verbindungen der allgemeinen Formel I mit  $R^1 = (c)$  sowie (d) und  $R^7 = (a)$ , (b), (e) und (f) erhalten werden.

- 13 -

Die Zielverbindungen der allgemeinen Formel I mit Amidinstruktur sind aus den Cyanverbindungen in bekannter Weise erhältlich, wobei in der Regel durch Addition von  $H_2S$  an die Cyangruppe zunächst die Thioamide erhalten werden, die durch S-Methylierung mit Methyljodid in die Thioimidoester und anschließend durch Behandlung mit Ammoniumacetat in alkoholischer Lösung in die Amidinoverbindungen überführt werden. Außerdem können gegebenenfalls aus den Cyanverbindungen mit Methanol oder Ethanol in Gegenwart von HCl-Gas und in bestimmten Fällen eines inerten Lösungsmittels die entsprechenden Imidoesterhydrochloride dargestellt werden, deren Umsetzung in alkoholischer Ammoniaklösung zu den Amidinoverbindungen führt.

Die erfindungsgemäßen Urokinaseinhibitoren können gegebenenfalls zusammen mit mindestens einem geeigneten pharmazeutischen Hilfs- oder Trägerstoff zur Herstellung von oral, subkutan oder intravenös verabreichbaren Arzneimitteln zur Tumorbekämpfung oder in der Diagnostik verwendet werden. Ebenfalls möglich ist die Verabreichung in Kombination mit anderen Wirkstoffen, z.B. anderen Urokinaseinhibitoren wie etwa Antikörpern oder/und Peptiden.

Die Arzneimittel zur Tumorbekämpfung bei Menschen und Tieren können topisch, oral, rektal oder parenteral, z.B. subkutan oder intravenös, in Form von Tabletten, Dragees, Kapseln, Pellets, Suppositorien, Lösungen oder transdermalen Systemen, wie Pflastern, verabreicht werden.

Besonders bevorzugt handelt es sich bei der Verbindung der Formel (I) um  $N\alpha$ -(2,4,6-Triisopropyl-phenylsulfonyl)-3-amidino-(D,L)-phenylalanin-4-ethoxycarbonyl-piperazid-hydrochlorid bzw. um das L-Entantiomere davon oder um ein pharmazeutisch verträgliches Salz dieser Verbindungen. Diese Substanzen haben ein gutes Löslichkeitsverhalten. In Trispuffer (pH 7,3) sind sie bis zu einer Konzentration von  $5 \times 10^{-5}$  mol/l löslich. Durch Zusatz

- 14 -

von 5% Ethanol steigt die Löslichkeit auf  $2 \times 10^{-4}$  mol/l und bei Zusatz von 5% DMSO auf  $10^{-3}$  mol/l.

Die erfindungsgemäßen Verbindungen sind in der Lage, hocheffizient das Wachstum oder/und die Ausbreitung von malignen Tumoren zu hemmen, z.B. die Tumorausbreitung beim Pankreaskarzinom, das Tumörwachstum des Mammakarzinoms sowie die Metastasierung von Tumoren. Dabei können die uPA-Inhibitoren gegebenenfalls zusammen mit anderen Antitumormitteln oder mit anderen Behandlungsarten, z.B. Bestrahlung oder chirurgischen Eingriffen, eingesetzt werden. Weiterhin sind die erfindungsgemäßen Inhibitoren auch für andere uPA-assoziierte Erkrankungen wirksam (z.B. bei der Verhinderung der Blasenbildung bei der Hauterkrankung Pemphigus vulgaris).

Erfindungsgemäße uPA Inhibitoren sind vorzugsweise dadurch gekennzeichnet, daß sie einen mindestens zweifach, vorzugsweise mindestens 5-fach und besonders bevorzugt mindestens 10-fach geringeren  $K_i$ -Wert für uPA gegenüber tPA aufweisen. Weiterhin ist bemerkenswert, daß die erfindungsgemäßen Verbindungen die Blutgerinnung nur geringfügig beeinflussen, da sie für eine effektive Hemmung von Thrombin und Faktor Xa zu hohe  $K_i$ -Werte haben.

Die erfindungsgemäßen Substanzen der Formel I können in Form von Konjugaten mit physiologisch wirksamen Substanzen eingesetzt werden, z.B. mit Radiomarkierungen oder mit zytotoxischen Mitteln, z.B. Chemotherapeutika wie cis-Platin oder 5-Fluor-Uracil, oder Peptiden. Weiterhin können die Substanzen auch in die Membran von Trägersvesikeln, z.B. Liposomen, eingebaut werden und somit ein Targeting von in den Trägersvesikeln eingeschlossenen Wirksubstanzen, z.B. zytotoxischen Mitteln wie etwa Doxorubicin ermöglichen.



Eine weitere Indikation für die Substanzen der allgemeinen Formel II:



5     worin X einen beliebigen Rest, insbesondere einen organischen Rest  
darstellt, z.B. einen Rest wie für Verbindungen der Formel I definiert, aber  
auch einen anderen Rest, z.B. eine physiologisch wirksame Substanz wie  
etwa ein zytotoxisches Mittel, ein Peptid oder eine Radiomarkierung, ein  
Lipid oder ein Kohlenhydrat bedeutet, und R<sup>2</sup> eine Gruppe wie zuvor  
10     definiert bedeutet, insbesondere einen 2,4,6-dreifach substituierten  
Phenylrest, z.B. 2,4,6-Triisopropylphenyl, ist das Targeting von Lymphzel-  
len, welches aufgrund ihrer um den Faktor 10 bis 20 höheren Affinität für  
Lymphknotengewebe gegenüber anderen Gewebetypen möglich wird.  
Vorzugsweise ist R<sup>2</sup> über eine Sulfonylgruppe -SO<sub>2</sub>- mit dem Rest X  
15     verbunden. Somit eignen sich diese Substanzen hervorragend als Mittel zur  
Diagnostik oder zur Behandlung von Erkrankungen des Lymphgewebes, ins-  
besondere malignen Erkrankungen wie etwa Tumormetastasen und  
Lymphomen. Die Verabreichung der Substanzen kann wie zuvor bereits  
beschrieben erfolgen. Eine Behandlung von Erkrankungen des Lymphgewe-  
20     bes erfolgt vorzugsweise durch eine mehrtägige Verabreichung des  
Medikaments, z.B. über einen Zeitraum von 5 bis 20 Tagen, mit einer  
anschließenden Behandlungspause und gegebenenfalls ein oder mehr-  
maligem Wiederholen der Applikation.

25     Die Erfindung soll an den folgenden Beispielen und Abbildungen näher  
erläutert werden. Es zeigen:

Figur 1     das Ergebnis einer Zytotoxizitätsbestimmung einer erfindungs-  
gemäßen Substanz,

30

Figur 2     das Ergebnis eines Versuchs zur Inhibierung des Abbaus einer  
Fibrinmatrix durch humane Mammakarzinomzellen,

- 16 -

Figuren 3

und 4 die Wirkung einer erfindungsgemäßen Substanz auf die Ausbreitung, das Wachstum und die Metastasierung von Mammakarzinomzellen in der Ratte,

5

Figur 5 die Wirkung einer erfindungsgemäßen Substanz auf das Wachstums eine Pankreastumors in der Ratte und

Figur 6 die Wirkung einer erfindungsgemäßen Substanz auf das Wachstum humaner Mammakarzinomzellen in Mäusen.

10

### Beispiele

1. ***N*-2,4,6-Triisopropylphenylsulfonyl-(L)-3-amidino-phenylalanin-4-ethoxycarbonyl-piperazid-hydrochlorid**

15

1.1 ***N*-2,4,6-Triisopropylphenylsulfonyl-(L)-3-cyan-phenylalanin-methylester**

20

5 g (L)-3-Cyanphenylalanin-methylester wurden in 100 ml Dioxan suspendiert, 4,45 ml N-Methylmorpholin (NMM) zugefügt und 30 min gerührt. Nach Zugabe von 5,97 g 2,4,6-Triisopropylbenzolsulfochlorid in fester Form wurde 3 Tage gerührt, danach ausgefallenes NMM-HCl abfiltriert, das Lösungsmittel abdestilliert und das erhaltene Rohprodukt über Kieselgel (KG) 60 (Chloroform) gereinigt. Ausbeute: 8,34 g Sirup (90%).

25

1.2 ***N*-2,4,6-Triisopropylphenylsulfonyl-(L)-3-cyan-phenylalanin**

30

8,34 g der Verbindung 1.1 wurden in einer Mischung aus je 50 ml Essigsäure und 1 N Salzsäure 8 Std. unter Rückfluß erhitzt, nach dem Erkalten 2x mit Ethylacetat extrahiert, die vereinigten Ethylacetatlö-

- 17 -

sungen über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet und das Lösungsmittel abdestilliert. Nach Reinigung über KG 60 (Chloroform) wurden 5,8 g eines festen Produktes erhalten (72%).

5     **1.3     $\alpha$ -2,4,6-Trisopropylphenylsulfonyl-(L)-3-cyan-phenylalanin-4-ethoxycarbonyl-piperazid**

5,7 g der Verbindung 1.2 wurden in 100 ml Tetrahydrofuran (THF) gelöst, auf 0°C abgekühlt, 2,22 g  $\alpha$ -Hydroxybenzotriazol (HOBt),  
10     2,82 g Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) zugefügt und 30 min gerührt. Nach Zugabe von 3,94 g 1-Ethoxycarbonyl-piperazin in 30 ml THF wurde über Nacht gerührt, danach ausgefallenes Dicyclohexylurea (DCU) abfiltriert, das Lösungsmittel abdestilliert und das erhaltene Rohprodukt über KG 60 (Chloroform) gereinigt. Ausbeute: 7,1 g eines  
15     amorphen Pulvers (96%).

1.4     **$\alpha$ -2,4,6-Trisopropylphenylsulfonyl-(L)-3-amidino-phenylalanin-4-ethoxycarbonyl-piperazid Hydrochlorid**

20     7,1 g der Verbindung 1.3 wurden in 30 ml Pyridin gelöst, 30 Tropfen Triethanolamin (TEA) zugefügt, 10 min ein kräftiger Schwefelwasserstoffstrom eingeleitet und 2 Tage bei Raumtemperatur stehengelassen. Anschließend wurde das Lösungsmittel abdestilliert, der Rückstand in Ethylacetat gelöst, die organische Phase mit 1 N  
25     Salzsäure und gesättigter Kochsalzlösung gewaschen, über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet und das Lösungsmittel abdestilliert. 7,2 g des auf diese Weise erhaltenen Thioamids wurden in 250 ml Aceton gelöst, die Lösung mit 17 g Methyljodid versetzt und 2 Tage bei Raumtemperatur unter Lichtschutz stehengelassen. Danach wurde das  
30     Lösungsmittel abdestilliert, das Thioimidester-hydroiodid (8,5 g) in 50 ml Methanol gelöst, 1,9 g Ammoniumacetat zugefügt und der Ansatz 4 Std. bei 60°C erwärmt. Das nach Abdestillieren des Lösungsmittels

- 18 -

erhaltene Rohprodukt wurde über Sephadex LH20 (Methanol) gereinigt. Das auf diese Weise erhaltene Amidin-hydroiodid wurde über Ionenaustauscher (Amberlite IRA-420) in das Hydrochlorid übergeführt. Ausbeute: 5,3 g eines amorphen Pulvers (69%).

5

**2.  $\alpha$ -2,4,6-Triisopropylphenylsufonyl-(D,L)-3-amidinopenyl-alanyl-nipecotinsäure-benzylamid Hydrochlorid**

10

**2.1  $\alpha$ -2,4,6-Triisopropylphenylsulfonyl-(D,L)-3-cyan-phenylalanyl-nipecotinsäure-ethylester**

15

4,56 g  $\alpha$ -2,4,6-Triisopropylphenylsulfonyl-(D,L)-3-cyan-phenylalanin (aus (D,L)-3-Cyanphenylalanin-methylester-hydrochlorid und dem entsprechenden Sulfochlorid analog 1.1 und 1.2 dargestellt), 1,5 g HOBt und 2,42 g DCC wurden in 50 ml DMF gelöst, 1 Std. gerührt und danach 2,36 g Nipecotinsäure-ethylester zugefügt. Nach Rühren über Nacht wurde ausgefallenes DCU abfiltriert, das Lösungsmittel abdestilliert, der Rückstand in wenig Methanol gelöst und zur Kristallisation stehengelassen. Der gebildete Niederschlag wurde abgesaugt, mit Methanol gewaschen und getrocknet. Ausbeute: 4,46 g (75%).

20

**2.2  $\alpha$ -2,4,6-Triisopropylphenylsufonyl-(D,L)-3-cyan-phenylalanyl-nipecotinsäure**

25

4,4 g des vorher beschriebenen Ethylesters wurden in einer Mischung aus 35 ml Essigsäure und 25 ml 1 N HCl 2 Std. unter Rückfluß erhitzt. Nach Zugabe von 10 ml Wasser wurde zum Erkalten stehengelassen, wobei sich ein wachsartiges Produkt abschied. Nach Abgießen des Lösungsmittels wurden 200 ml Wasser zugesetzt, längere Zeit kräftig gerührt und die erhaltene feste Substanz

30

abgesaugt, mit Wasser gewaschen und getrocknet. Ausbeute: 3,84 g (92%).

**2.3  $\alpha$ -2,4,6-Triisopropylphenylsulfonyl-(D,L)-3-cyan-phenylalanyl-nipecotinsäure-benzylamid**

2,28 g der vorher beschriebenen Verbindung 0,6 g HOBt und 0,97 g DCC wurden in 20 ml DMF gelöst, 1 Std. gerührt, anschließend 0,6 g Benzylamin zugefügt und weiter über Nacht gerührt. Nach Abfiltrieren des ausgefallenen DCU wurde das Lösungsmittel abdestilliert, der Rückstand in Methanol gelöst und die Lösung in 5-proz. Natriumhydrogencarbonatlösung/Eis gegossen. Nach 1 Std. wurde der gebildete Niederschlag abgesaugt, mit Wasser gewaschen und im Vakuum getrocknet. Ausbeute: 2,48 g (94%).

**2.4  $\alpha$ -2,4,6-Triisopropylphenylsulfonyl-(D,L)-3-amidino-phenylalanyl-nipecotinsäure-benzylamid Hydrochlorid**

2,4 g der Verbindung 2.3 wurden in 30 ml Pyridin gelöst, 30 Tropfen TEA zugefügt, in die Lösung 10 min Schwefelwasserstoff eingeleitet und der Ansatz 2 Tage bei Raumtemperatur stengelassen. Anschließend wurde das Lösungsmittel abdestilliert, der Rückstand in Ethylacetat aufgenommen und mit 1 N HCl ausgeschüttelt. Nach Waschen der organischen Phase mit gesättigter Kochsalzlösung und Trocknen über Natriumsulfat wurde das Lösungsmittel abdestilliert. 2,38 g des auf diese Weise erhaltenen Thioamids wurden in 100 ml Aceton gelöst, die Lösung mit 6,5 g Methyljodid versetzt und 20 Std. bei Raumtemperatur unter Lichtschutz stengelassen. Danach wurde das Lösungsmittel abdestilliert, das Thioimidonester-hydroiodid in 50 ml Methanol gelöst, 0,5 g Ammoniumacetat zugegeben und der Ansatz 4 Std. bei 60°C im Wasserbad erwärmt. Das nach Abdestillieren des Lösungsmittels erhaltene Rohprodukt konnte über KG

- 20 -

60 gereinigt werden. Die Elution erfolgte zunächst mit Chloroform, danach mit Chloroform/Methanol 9:1. Das so gereinigte Amidinhydroiodid wurde über Ionenaustauscher (Amberlite IRA-420) in das Hydrochlorid übergeführt. Ausbeute: 1,45 g eines amorphen Pulvers (56%).

Die Charakterisierung der Verbindungen erfolgte massenspektrometrisch, eine Reinheitsprüfung erfolgte mittels DC und HPLC.

### 3. In vitro Hemmung von Urokinase durch ausgewählte Verbindungen der Formel I

Konfiguration	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	n	K <sub>i</sub> , $\mu\text{mol/l}$
L	-N N-COOC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	TIPP	0	0,41
D,L	-N N-COOC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	TIPP	0	0,96

Abkürzungen: TIPP - 2,4,6-Triisopropylphenyl

#### Bestimmung der Hemmwirkung

Zur Bestimmung der Inhibitoraktivität wurden 200  $\mu\text{l}$  Tris-Puffer (0,05 mol/l, den Inhibitor enthaltend, 0,154 mol/l NaCl, 5% Ethanol pH 8,0), 25  $\mu\text{l}$  Substrat (Pefachrome UK oder Bz- $\beta$ Ala-Gly-Arg-pNA in H<sub>2</sub>O; Pentapharm Ltd., Basel, Schweiz) und 50  $\mu\text{l}$  sc-Urokinase (Ribosepharm GmbH, Haan, Deutschland) bei 25°C inkubiert. Nach 3 min wurde die Reaktion durch Zugabe von 25  $\mu\text{l}$  Essigsäure (50%) unterbrochen und die Absorption bei 405 nm mittels Microplate Reader (MR 5000, Dynatech, Denkendorf, Deutschland) bestimmt. Die K<sub>i</sub>-Werte wurden nach Dixon durch lineare

Regression mittels eines Computerprogramms ermittelt. Die  $K_i$ -Werte sind das Mittel aus mindestens 3 Bestimmungen, die Standardabweichung lag unter 25%.

- 5 4. In vitro Hemmung verschiedener Serinproteasen vom Trypsin-Typ durch (N $\alpha$ -(2,4,6-Trisopropyl-phenylsulfonyl)-(L)-3-amidino-phenylalanin-4-ethoxycarbonyl-piperazid (uPA-Inhibitor) und N $\alpha$ -2-Naphthylsulfonyl-3-amidinophenylalanin-N'-methylpiperazid (Naphthylsulfonyl-Derivat) als Vergleich

10

Enzym	K <sub>i</sub> [ $\mu$ mol/l]	
	uPA-Inh.	Naphthylsulfonyl-Der.
Urokinase	0,41	150
Plasmin	0,39	55
Sc-tPA	4,9	430
15 Thrombin	0,49	0,036
Faktor Xa	1,7	30
Faktor XIIa	13	> 1000
Plasma-Kallikrein	7,2	85
Glandulär-Kallikrein	> 1000	> 1000
20 Trypsin	0,037	1,3
Tryptase	6,3	33

Die Bestimmung der Hemmwirkung für die verwendeten Enzyme erfolgte nach dem in Beispiel 3 beschriebenen Prinzip.

25

Aus den oben angegebenen Werten ist ersichtlich, daß der erfindungsgemäße Urokinasehemmstoff uPA-Inhibitor überraschenderweise einen um mehr als den Faktor 10 kleineren  $K_i$ -Wert für Urokinase als für Einzelketten tPA (Sc-tPA) aufweist. Somit eignen sich die erfindungsgemäßen Substanzen als selektive Urokinaseinhibitoren. Zum Vergleich ist die Inhibitor-

30

aktivität des Naphthylsulfonyl-Derivats angeführt, das eine signifikant geringere in vitro Anti-uPA-Aktivität aufweist.

## **5. Bestimmung der Zytotoxizität**

5

Für die Bestimmung der Zellproliferation/Zytotoxizität wurde ein kommerziell erhältlicher Test eingesetzt (Promega), welcher auf der zellulären Umsetzung eines Tetrazoliumsalzes beruht. Das aus dieser Reaktion resultierende farbige Produkt kann mittels eines ELISA-Spektrometers (ICN-Flow) quantifiziert werden. Der synthetische Inhibitor (offene Kreise) hatte gegenüber dem Lösungsmittel (geschlossene Kreise) alleine keinen Einfluß auf das Zellwachstum humaner Ovarialkarzinomzellen OV-MZ-6 (Figur 1). Somit ist der erfindungsgemäße uPA-Inhibitor in pharmakologisch wirksamen Konzentrationen bis 40 µM nicht zytotoxisch.

15

## **6. Inhibierung des Abbaus einer Fibrin-Matrix durch humane Mammakarzinomzellen**

Zur Untersuchung der Fähigkeit von Tumorzellen eine extrazelluläre Matrix abzubauen, wurde ein Fibrinmatrixabbau-Test entwickelt und verwendet. Je größer die proteolytische Aktivität der Tumorzellen, um so höher ist die Konzentration der Fibrinabbauprodukte im Matrixüberstand. Der Matrixabbaukapazität entspricht der Konzentration der Fibrinabbauprodukte, welche mittels ELISA (D-Dimer) ermittelt werden.

25

Die Fibringlele wurden in 24 Well Kulturplatten aus 200 µl Fibrinogen (50 mg/ml) in PBS (pH 7,4) durch 50 µl Thrombin (10 U/ml) und 50 µl CaCl<sub>2</sub> (150 mM) pro Well nach Inkubation für 30 min bei 37°C gebildet. 2 x 10<sup>5</sup> Mammakarzinomzellen wurden auf diese Fibrinmatrix in 1 ml DMEM Kulturmedium, plus 10% fetalem Kälberserum und 2 µg Glu-Plasminogen ausgesät und 4 h lang inkubiert. Danach wurde der Überstand zentrifugiert, um Zellen zu entfernen, und die Fibrinabbauprodukte mittels ELISA

30



quantifiziert. Die Zugabe des erfindungsgemäßen Inhibitors (A) in unterschiedlichen Konzentrationen führte zu einer signifikanten Inhibierung des Matrixabbaus durch Mammarkarzinomzellen im Vergleich zu dem Naphthyl-Derivat (B), das keine Hemmung des Fibrinabbaus durch Mammarkarzinomzellen zeigt (Figur 2).

## **7. In vivo Test des uPA Inhibitors auf Tumorausbreitung, Tumorstadium und Metastasierung in der Ratte**

### **10 A) Brustkrebs-Modell**

10-25 mm<sup>3</sup> Rattenbrustkrebs-Tumorfragmente BN-472 wurden subkutan orthotropisch unter die Fettpolster der Brustdrüse in 6 bis 7 Wochen alten, weiblichen Brown Norwegian Ratten transplantiert (Tag 0). Die Behandlung der Tiere wurde 24 h nach der Tumordinokulation intraperitoneal begonnen. Jede Gruppe bestand aus 8 Tieren. Die Kontrollgruppe erhielt nur Injektionslösung (100 µl einer 10% Ethanol/Saline (0,9% NaCl) Lösung). Der Vergleichsgruppe des Naphthyl-Derivats (B) und der Therapiegruppe des erfindungsgemäßen uPA-Inhibitors (A) wurden in der oben genannten Lösung eine Dosis von 1 mg/kg Körpergewicht täglich i.p. verabreicht. Die Behandlung wurde über einen Zeitraum von 4 Wochen durchgeführt.

Die Abmessungen der subkutanen Tumoren und die Gewichte der Tiere wurden wöchentlich bestimmt. Am Ende der Behandlung wurden die Tiere getötet und Tumorgewichte, Organgewichte und die Anzahl von Metastasen in relevanten Geweben bestimmt.

Die Behandlung mit uPA-Inhibitor (A) führte zu einer signifikanten Reduktion des Primärtumorgewichtes sowie der axillären Lymphknoten ( $p = 0,003$  bzw.  $p = 0,005$ ) im Vergleich mit dem Naphthyl-Derivat (B) und Kontrollgruppen ohne Inhibitor (Fig. 3 und 4). Die Gewichte

- 24 -

von Lunge, Leber, Niere und Milz bei den mit dem uPA-Inhibitor behandelten Tieren waren unverändert gegenüber den Kontrolltieren.

## **B) Pankreaskarzinom-Modell**

5

10

Fragmente des transplantierbaren und metastasierenden Pankreasadenokarzinoms CA20948 der Ratte wurden aus Donortieren explantiert. Nach Zellvereinzelung wurden gleiche Mengen an suspendierten Tumorzellen zusammen mit 2 mg Matrigel jedem der Empfängertiere, männlichen 10 Wochen alten Lewisratten (n=9), subkutan implantiert. Die Durchführung der Behandlung sowie Zusammensetzung der Therapiegruppen war identisch wie unter A).

15

Wie aus Figur 5 ersichtlich ist, findet man beim erfindungsgemäßen uPA-Inhibitor (offene Kreise) gegenüber dem Naphthyl-Derivat (geschlossene Kreise) und der Kontrollgruppe (Dreiecke) eine signifikante Verringerung des Tumorgewichts und eine Verminderung des Wachstums bei den entstehenden Ratten-Pankreaskarzinom.

20

## **C) Wiederholung der Versuche mit geänderter Applikationsart**

25

Die in den Abschnitten A und B beschriebenen Versuche wurden mit geänderter Applikationsart des Inhibitors wiederholt. Dabei wurde ohne Veränderung der täglichen Dosis der Inhibitor im Mammakarzinom-Modell subkutan (n=9) und im Pankreasadenokarzinom-Modell intraperitoneal (n=8) appliziert. Die Ergebnisse dieser Wiederholungsversuche entsprachen in Tendenz und Umfang den bereits dargestellten Ergebnissen.

30

**D) Zusammenfassung der Ergebnisse**

In allen Versuchen wurde durch Behandlung mit dem Inhibitor eine erhebliche Reduktion der TumorgroÙe bzw. des Tumorgewichts und der Anzahl bzw. der Masse von Tochtergeschwülsten im Vergleich zu den Kontrollgruppen erreicht. Im Mammatumor-Modell waren in der Inhibitor-behandelten Gruppe, die mittleren Tumorgewichte am Ende der Behandlung auf 23% (i.p.) bzw. 37% (auf s.c.) im Vergleich zu der mit Vehikel behandelten Kontrolle reduziert. Die Anzahl der Lungenfoci in Inhibitor-behandelten Gruppen waren auf 9% (i.p.) bzw. 32% (s.c.) und die mittleren Gewichte der axillären Lymphknoten auf 27% (i.p.) bzw. 48% (s.c.) reduziert.

Im Pankreastumor-Modell waren die Massen des tumorhaltigen Pankreas in den Inhibitor-behandelten Gruppen um 76% (i.p.) bzw. 34% (s.c.), die Massen der subkutanen Tumoren um 54% (i.p.) bzw. 60% (s.c.) verglichen mit den jeweiligen Vehikel-behandelten Gruppen reduziert. Die Anzahl detektierter Leberfoci in Inhibitor-behandelten Gruppen war 29% (i.p.), bzw. 2% (s.c.) im Vergleich zu den Vehikel-behandelten Kontrollgruppen.

Die Entwicklung der Körpergewichtszunahme und der Vergleich der Organgewichte zwischen Inhibitor- und Vehikel-behandelten Gruppen lieÙen keine Hinweise für eine etwaige erhebliche Toxizität des Inhibitors unter den beschriebenen Bedingungen erkennen.

**8. Behandlung humaner Brustkrebszellen in der Nacktmaus**

Um die in vivo Effizienz des Inhibitors zur Hemmung des Tumorwachstums humaner Mammakarzinomzellen zu testen (MDA-BA-231), wurden  $6 \times 10^6$  Zellen subcutan in die rechte Flanke von Balb/c Nacktmäusen (4-6 Wochen alt) injiziert. Die Tumorzellen wurden vor Inokulation mit dem synthetischen

- 26 -

uPA-Inhibitor vorinkubiert. Nach 24 h wurden die Mäuse mit einer Dosis von 1,2 mg/kg Körpergewicht intraperitoneal wie unter A) beschrieben zweimal wöchentlich behandelt. Die Tumorgroße wurde wöchentlich durch Messung der zwei größten Durchmesser bestimmt.

5

Wie aus Figur 6 ersichtlich ist, nimmt das Tumolvolumen bei der Verabreichung des uPA-Inhibitors (offene Kreise) signifikant langsamer zu als in der Kontrollgruppe (geschlossene Kreise) wo Ethanol in Saline verabreicht wurde.

10

#### 9. Die Biodistribution des Inhibitors in der Ratte

Die Biodistribution des Inhibitors wurde in zwei unabhängigen Versuchen in Gewebeaufschlüssen von Ratten ermittelt, die 5 bzw. 10 Tage lang täglich einmal mit 1 mg/kg Inhibitor i.p. behandelt worden waren. Zum Aufschluß wurden jeweils 100 mg Gewebe mechanisch zerkleinert und mit 200 µl 1 % Triton X-100 in physiologischer Kochsalzlösung vermischt. Nach Zugabe von 400 µl Ethanol wurde der Aufschluß 1 min mit Ultraschall behandelt. Der Gewebeextrakt wurde 15 min bei 12.000 x g zentrifugiert. Zur Vorreinigung wurde der Überstand auf eine mit 1 ml Methanol und 1 ml Wasser equilibrierte C18-Silica Reversed Phase Vorsäule (Sep-Pak® cartridge C18, 1 ml Waters, Eschborn, Deutschland) aufgetragen, hintereinander mit 2 x 1 ml H<sub>2</sub>O, 1 ml 10% Methanol, 1 ml H<sub>2</sub>O, 1 ml 5% Acetonitril, 0,04% Perchlorsäure und 1 ml H<sub>2</sub>O gewaschen und mit 500 µl 75 % Acetonitril, 0,04% Perchlorsäure eluiert. Die HPLC-Analytik wurde auf einer Reversed Phase C18 Silica Säule mit einem 5-55%igen Acetonitril Gradienten mit 0,04% Perchlorsäure durchgeführt.

25

30

Die Konzentrationen des Inhibitors in den jeweils untersuchten Gewebetypen (µg/g) sowie in Blutplasma und Galle (µg/ml) und zum Vergleich eines entsprechenden Naphthylsulfonylderivats sind in der nachfolgenden Tabelle dargestellt.

**Tabelle**

Verteilungsprofil einer erfindungsgemäßen Substanz in verschiedenen Geweben bzw. Blutplasma und Galle im Vergleich zu einem Naphthylsulfonyl-Derivat (N $\alpha$ -2-Naphthylsulfonyl-3-amidinophenylalanin-4-ethoxycarbonyl-piperazid)

Gewebe	Gehalt ( $\mu$ g/g)		
	uPA-Inhibitor 1 mg/kg i.p. 5 Tage	uPA-Inhibitor 1 mg/kg i.p. 10 Tage	Naphthylsulfonyl- Derivat 1 mg/kg i.p., 5 Tage
Milz	2,02	2,48	0,089
Leber	2,85	2,08	0,12
Niere	2,67	2,48	0,085
Muskel	0,74	< 0,5	0,008
Fett Niere	0,82	1,0	< 0,005
Herz	<0,5	1,09	0,59
Lunge	3,70	1,81	0,020
Gehirn	<0,5	<0,5	
Lymphknoten Trachea	7,45	16,38	0,12
Lymphknoten Achsel	1,97	2,74	<0,005
Lymphknoten Knie	7,83	3,8	<0,005
Gehalt ( $\mu$ g/ml)			
Plasma	0,008	0,035	0,004
Galle	1,96	1,75	0,097

In den meisten untersuchten Gewebetypen lag nach 5 bis 10 Tagen der Inhibitor in einer Größenordnung von 1 bis 3  $\mu$ g/g vor. Die Plasmakonzentrationen des Inhibitors lagen 24 h nach der jeweils letzten i.p. Applikation jeweils ein bis zwei Größenordnungen unter den mittleren Gewebekonzen-

- 28 -

trationen. Daraus kann auf eine hohe Affinität für Gewebe und eine niedrige Plasmaeiweißbindung geschlossen werden. Die Konzentrationen des im Vergleich über 5 Tage applizierten Naphthylsulfonyl-Derivats waren in den verschiedenen Geweben 20-30 fach geringer.

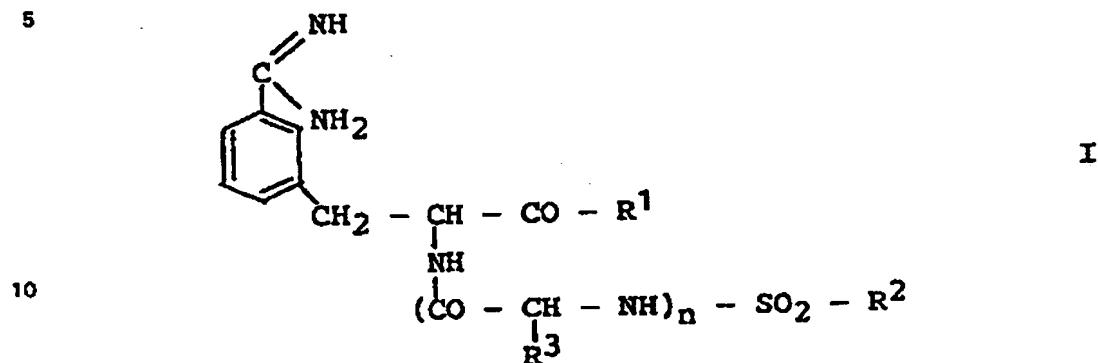
5

Der Inhibitor zeigt eine auffallende Anreicherung in den Lymphknoten. In den unabhängigen Versuchen wurden in trachealen Lymphknoten nach 5-tägiger Applikation Konzentrationen 5,3 bzw. 7,5  $\mu\text{g/g}$ , nach 10 tägiger Applikation 21,6 bzw. 16,4  $\mu\text{g/g}$  gemessen. Da Tumorzellen sich regelmäßig

10 über lymphatische Bahnen disseminieren, ist die spezifische Anreicherung des Inhibitors in den Lymphgefäßen von Bedeutung und Vorteil für dessen Einsatz als anti-metastatisches Therapeutikum.

## Ansprüche

## 1. Verwendung von Verbindungen der Formel I



die als Racemate sowie als D- oder L-konfigurierte Verbindungen vorliegen und in denen

15 R1 (a) OH oder OR<sup>4</sup> ist, wobei R<sup>4</sup> ein gegebenenfalls substituier-  
tes, verzweigtes oder unverzweigtes C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-Alkyl,  
C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>-Cycloalkyl oder Aralkyl ist,

(b) eine Gruppe der Formel  $\text{-N} \begin{array}{l} \text{R}^5 \\ \text{R}^6 \end{array}$  darstellt, in welcher  $\text{R}^5$

und  $R^6$  beliebige Reste sind, wobei insbesondere

(i)  $R^5$  und  $R^6$  H sind,  
(ii)  $R^5$  H ist und  $R^6$  ein gegebenenfalls substituiertes verzweigtes oder unverzweigtes  $C_1$ - $C_8$ -Alkyl, Aralkyl, oder  $C_5$ - $C_8$  Cycloalkyl ist,

(iii)  $R^5$  und  $R^6$  jeweils unabhängig ein gegebenenfalls substituiertes, unverzweigtes oder verzweigtes  $C_1$ - $C_4$  Alkyl sind oder

(iv)  $R^5$  H ist und  $R^6$  - $NH_2$  oder eine insbesondere mit Aryl oder Heteroaryl substituierte Aminogruppe ist,

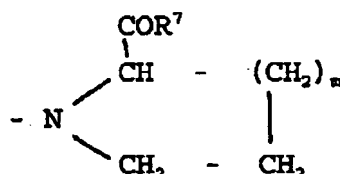
- 30 -

- (v)  $R^5$  H oder ein gegebenenfalls substituiertes, unverzweigtes oder verzweigtes  $C_1$ - $C_4$  Alkyl ist oder  $R^6$  der Rest einer Aminosäure, eines Peptids oder eines Polypeptids ist,

5

- (c) eine Gruppe der Formel

10

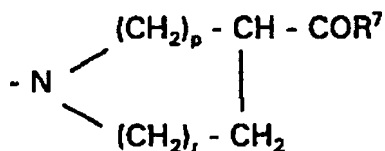


darstellt, in welcher  $m$  die Zahl 1 oder 2 bezeichnet, und in welcher eine oder mehrere der Methylengruppen gegebenenfalls substituiert sind, wobei die Gruppe (c) racemisch oder D- bzw. L-konfiguriert ist, und  $R^7$  die Bedeutung von  $R^1$  in den Ziffern (a), (b) und (f) aufweist,

15

- (d) eine Gruppe der Formel

20



darstellt, in welcher  $p = r = 1$ ,  $p = 1$  und  $r = 2$  oder  $p = 2$  und  $r = 1$  sind und in welcher eine oder mehrere der Methylengruppen gegebenenfalls substituiert sind, und  $R^7$  die Bedeutung von  $R^1$  in Ziffer (a), (b) und (f) aufweist.

25

30

- (e) eine Piperidylgruppe darstellt, die gegebenenfalls in einer der Stellungen 2, 3 und 4 substituiert ist,



- 31 -

wobei gegebenenfalls an die heterocycloaliphatischen Ringe der Formeln (c), (d), (e) ein weiterer aromatischer oder cycloaliphatischer Ring in 2,3 oder 3,4 Stellung, bezogen auf das Heteroatom, ankondensiert ist,

5

(f) eine Gruppe der Formel



10

darstellt, in welcher R<sup>8</sup>

- (i) einen gegebenenfalls substituierten C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-Alkyl- oder Arylrest,
- (ii) einen gesättigten oder ungesättigten, verzweigten oder unverzweigten C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-Alkoxyrest oder
- (iii) einen gegebenenfalls substituierten Phenoxy- bzw. Benzyloxycarbonylrest bedeutet,

15

(g) einen Acylrest der Formel -COX darstellt, wobei X

- (i) H, einen gegebenenfalls substituierten unverzweigten oder verzweigten Alkylrest,
- (ii) einen gegebenenfalls substituierten Aryl- oder Heteroarylrest, oder
- (iii) einen gegebenenfalls substituierten Cycloalkylrest bedeutet,

20

25

(h) einen Aralkylrest darstellt, in dem der aromatische Rest gegebenenfalls substituiert ist,

(i) einen Carbonsäureamidrest der Formel -CONR'R", einen Thiocarbonsäureamidrest -CSNR'R" oder einen Essigsäureamidrest -CH<sub>2</sub>-CONR'R" darstellt, wobei

30

- (i) R' und R" H sind,

- 32 -

- 5
- (ii) R' und R" jeweils unabhängig C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-Alkyl sind,
  - (iii) R' H ist und R" C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-Alkyl ist,
  - (iv) R' H ist und R" Aryl ist, oder
  - (v) R' und R" mit dem Stickstoffatom einen hetero-  
cycloaliphatischen Ring mit 5-7 Ringgliedern, der  
ein weiteres Heteroatom tragen kann, bilden,
- 10
- (j) einen SO<sub>2</sub>-Y-Rest darstellt, in dem Y
    - (i) ein gegebenenfalls substituiertes C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-Alkyl,
    - (ii) ein gegebenenfalls substituiertes Aryl oder Hete-  
roaryl bzw. O-Aryl oder O-Heteroaryl, oder
    - (iii) -NR'R" ist, wobei R' und R" jeweils unabhängig  
H oder C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>-Alkyl bedeuten,
- 15
- (k) einen cycloaliphatischen Ring mit 5 bis 8 C-Atomen  
darstellt, der gegebenenfalls substituiert ist,
- 20
- (l) einen gegebenenfalls substituierten Heteroarylrest oder  
heterocycloaliphatischen Rest darstellt,
- 25
- (m) einen funktionalisierten Alkylrest der Formel -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-X  
darstellt, wobei die Alkylkette unverzweigt oder ver-  
zweigt ist, n = 1 bis 8 bedeutet und der funktionelle  
Rest X
    - (i) eine Hydroxylgruppe darstellt, deren H-Atom  
gegebenenfalls durch eine C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-Alkyl-, Aralkyl-,  
z.B. Benzyl oder Phenylethyl, Aryl-, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-Hy-  
droxyalkyl- oder Acylgruppe CO-Alkyl (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>),  
substituiert ist,
    - (ii) ein Halogenatom bedeutet,
    - (iii) eine tertiäre Aminogruppe der Formel -N(Alk)<sub>2</sub>  
darstellt, wobei die Alkylgruppen 1 bis 3 C-
- 30

- 33 -

Atome besitzen und das Stickstoffatom gegebenenfalls einem heterocycloaliphatischen Ring mit 5-7 Ringgliedern, der ein weiteres Heteroatom, S tragen kann, angehört,

5

$R^2$  einen gegebenenfalls substituierten Phenylrest darstellt,

$R^3$  H oder verzweigtes bzw. unverzweigtes  $C_1$ - $C_4$ -Alkyl ist und n 0 oder 1 bedeutet.

10

oder von Salzen der Verbindungen zur Herstellung eines Mittels für die Diagnostik, Therapie und Prävention von Urokinase- oder Urokinaserezeptor-assoziierten Krankheiten.

15

2. Verwendung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß  $R^1$  eine Gruppe der Formeln (b), (d) und (f) ist,  $R^2$  einen 2,4,6-Triisopropylphenyl-Rest darstellt, und  $n=0$  ist.

20

3. Verwendung nach Ansprüchen 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Verbindung der Formel I  $N\alpha$ -(2,4,6-Triisopropyl-phenylsulfonyl)-3-amidino-(D,L)-phenylalanin-4-ethoxycarbonyl-piperazid, das L-Enantiomer oder ein pharmazeutisch verträgliches Salz einer der Verbindungen ist.

25

4. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Verbindungen in Form von physiologisch verträglichen Säuresalzen, insbesondere als Hydrochloride, vorliegen.

30

- 34 -

5. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 4 zur Tumorbekämpfung.
6. Verwendung nach Anspruch 5 zur Bekämpfung von Mammakarzinomen, Pankreaskarzinomen und der Metastasenbildung.
7. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 4 zur Bekämpfung von Pemphigus vulgaris.
8. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Verbindungen der Formel I als Konjugate mit weiteren pharmakologisch wirksamen Substanzen eingesetzt werden.
9. Verwendung nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß die Verbindungen als Konjugate mit Radiomarkierungen oder mit zytotoxischen Substanzen eingesetzt werden.
10. Verwendung von Verbindungen der Formel II
- $$X-R^2$$
- worin
- X einen beliebigen Rest darstellt und
- R<sup>2</sup> einen gegebenenfalls substituierten Phenylrest darstellt,
- oder von Salzen dieser Verbindungen zur Herstellung eines Mittels für das Targeting von Lymphzellen.
11. Verwendung nach Anspruch 10, worin R<sup>2</sup> ein 2,4,6-dreifach substituiertes Phenylrest, insbesondere 2,4,6-Triisopropyl ist.
12. Verwendung nach Anspruch 10 oder 11 zur Diagnostik und Behandlung von Erkrankungen des Lymphgewebes.

- 35 -

13. Verwendung nach einem der Ansprüche 10 bis 12 zur Bekämpfung von Lymphomen und der Metastasenbildung.
- 5 14. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 13 zur Herstellung von oral, topisch, rektal oder parenteral verabreichbaren Arzneimitteln.
15. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 14 in Form von Tabletten, Dragees, Kapseln, Pellets, Suppositorien, Lösungen oder transdermalen Systemen, wie Pflastern.
- 10 16. Verfahren zur Urokinasehemmung bei Lebewesen, insbesondere beim Menschen, durch Verabreichung einer wirksamen Menge mindestens eines Urokinaseinhibitors nach einem der Ansprüche 1 bis 4.
- 15 17. Verfahren zum Targeting des Lymphgewebes bei Lebewesen, insbesondere beim Menschen, durch Verabreichung einer wirksamen Menge mindestens einer Verbindung nach einem der Ansprüche 10 bis 11.
- 20 18.  $N\alpha$ -(2,4,6-Triisopropyl-phenylsulfonyl)-3-amidino-(D,L)-phenylalanin-4-ethoxycarbonyl-piperazid, das L-Enantiomer davon oder ein pharmazeutisch verträgliches Salz einer der Verbindungen.

Fig 1

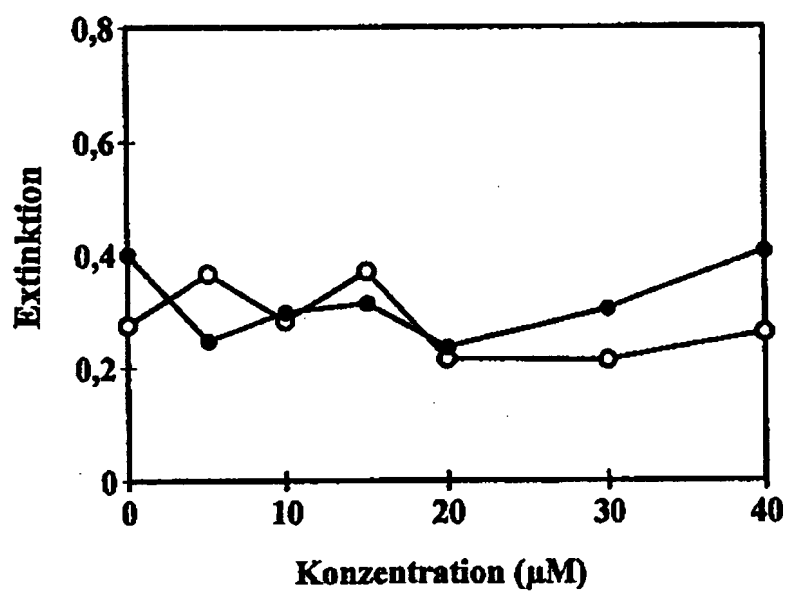
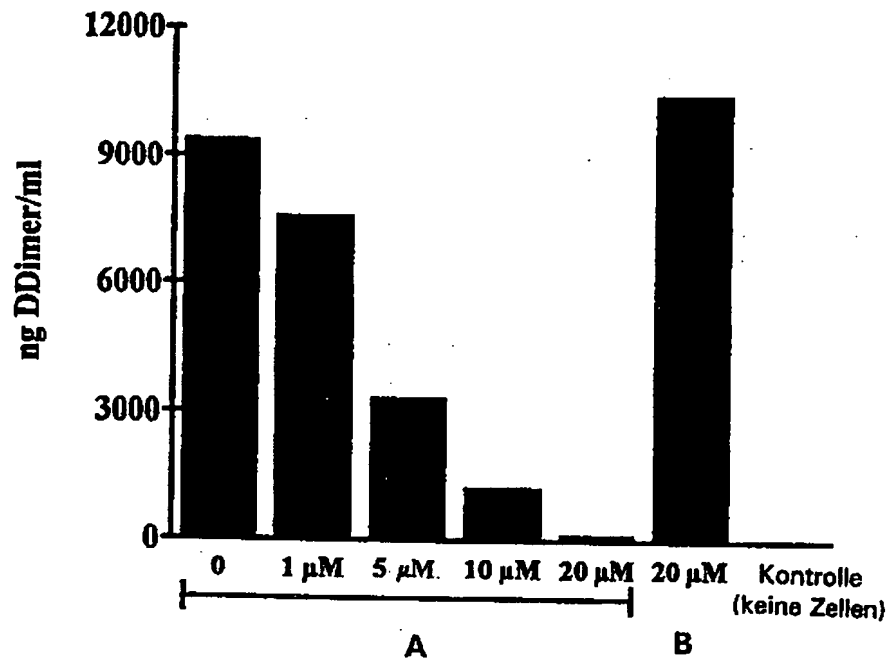


Fig 2



3/4

Fig 3

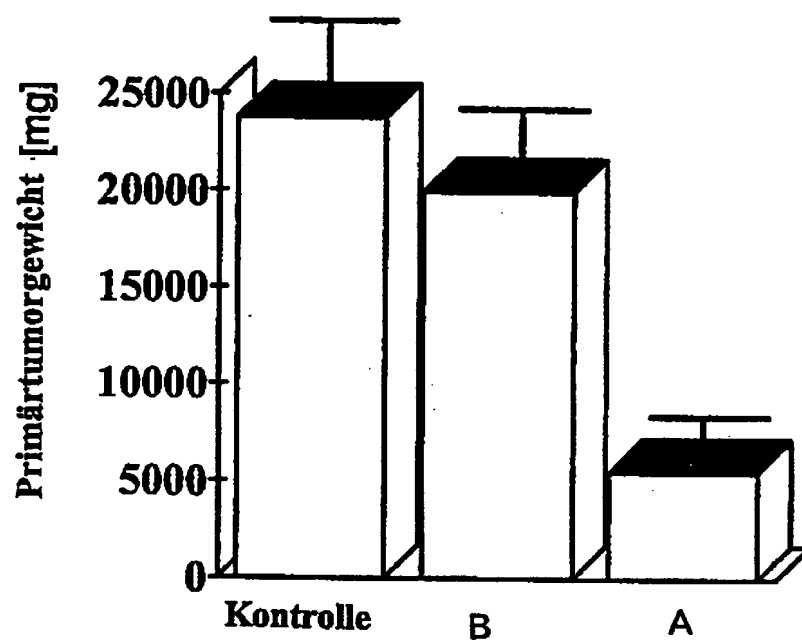


Fig 4

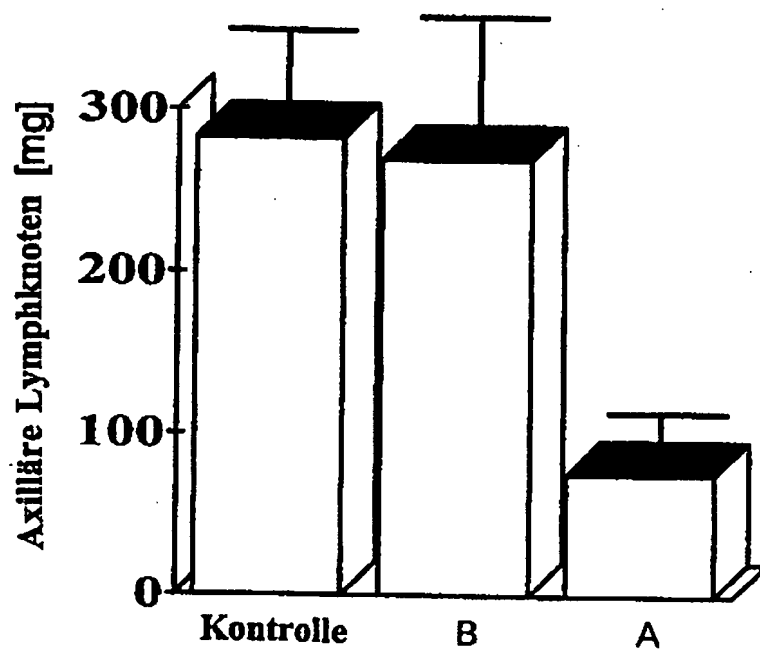




Fig 5

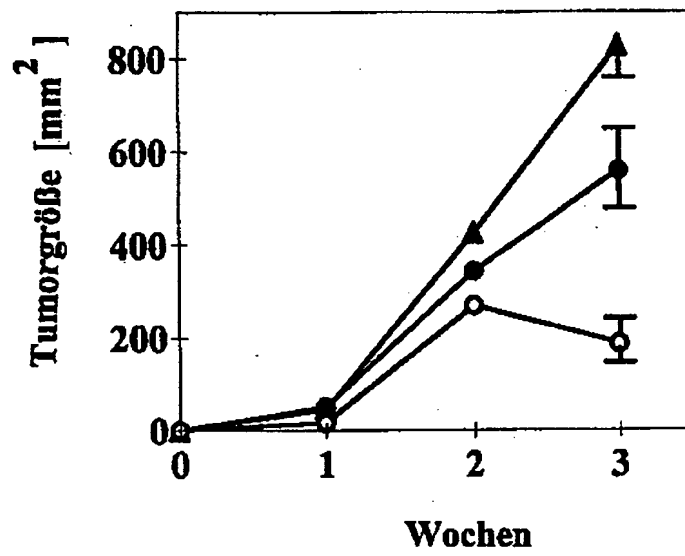
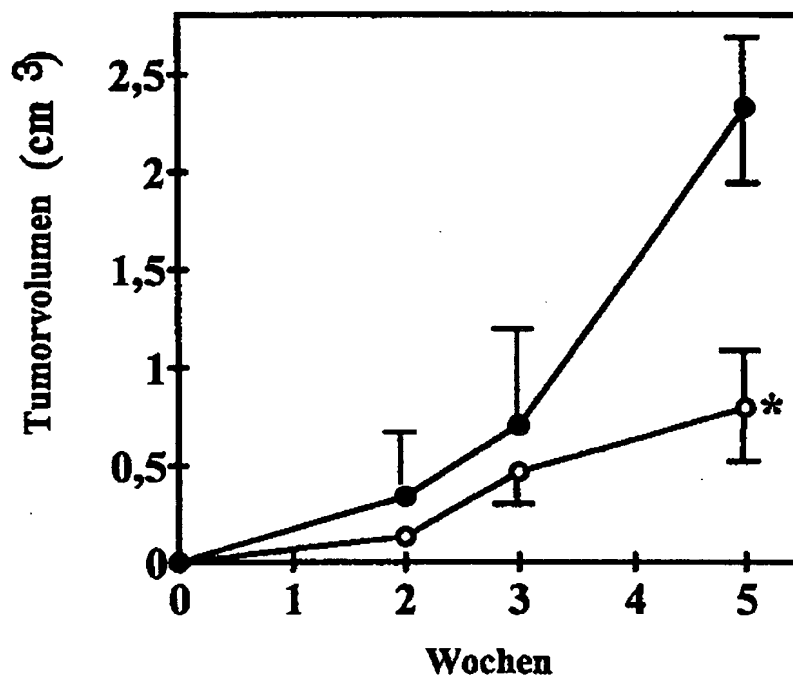


Fig 6



\* p = 0,014

**PCT**WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<b>(51) Internationale Patentklassifikation <sup>7</sup> :</b> <b>A61K 31/495, 31/445, 31/195, C07D 295/182, A61K 47/48</b>	<b>A3</b>	<b>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/04954</b> <b>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 3. Februar 2000 (03.02.00)</b>
<b>(21) Internationales Aktenzeichen:</b> PCT/EP99/05145 <b>(22) Internationales Anmeldedatum:</b> 20. Juli 1999 (20.07.99) <b>(30) Prioritätsdaten:</b> 98113519.7 20. Juli 1998 (20.07.98) EP <b>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US):</b> WILEX BIOTECHNOLOGY GMBH [DE/DE]; Grillparzer Strasse 10 B, D-81675 München (DE). <b>(72) Erfinder; und</b> <b>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US):</b> WILHELM, Olaf [DE/DE]; Säbener Strasse 188, D-81545 München (DE). MAG-DOLEN, Viktor [US/DE]; Moosacherweg 3, D-85551 Kirchheim (DE). STÜRZBECHER, Jörg [DE/DE]; Hubertusstrasse 38, D-99094 Erfurt (DE). POBKENS, John [NL/NL]; Filosofoentuin 35, NL-2908 XA Capelle a/d IJssel (NL). LUTZ, Verena [DE/DE]; Sankt-Wolfgangs-Platz 9F, D-81669 München (DE). <b>(74) Anwälte:</b> WEICKMANN, H. usw.; Kopernikuasstrasse 9, D-81679 München (DE).	<b>(81) Bestimmungsstaaten:</b> AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG). <b>Veröffentlicht</b> <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i> <b>(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts:</b> 22. Juni 2000 (22.06.00)	
<b>(54) Title: NOVEL UROKINASE INHIBITORS</b> <b>(54) Bezeichnung: NEUE UROKINASE-INHIBITOREN</b> <b>(57) Abstract</b> The invention relates to the use of derivatives of 3-amidino-phenyl-alanine as urokinase inhibitors for treating malignant tumors and the formation of metastases thereof. <b>(57) Zusammenfassung</b> Die Erfindung betrifft die Verwendung von Derivaten des 3-Amidino-phenylalanins als Urokinase-Inhibitoren zur Behandlung von malignen Tumoren und der Metastasierung.		

### LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 99/05145

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 A61K31/495 A61K31/445 A61K31/195 C07D295/182 A61K47/48

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 A61K C07D

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 96 05189 A (PENTAPHARM AG ;STUERZEBECHER JOERG (DE); VIEWEG HELMUT (DE); WIKST) 22 February 1996 (1996-02-22) claim 1	1,4-9, 14-16
Y	WO 92 08709 A (PENTAPHARM AG) 29 May 1992 (1992-05-29) cited in the application claim 1	1,4-9, 14-16
A		11-13
Y	WO 94 18185 A (PENTAPHARM AG ;STUERZEBECHER JOERG (DE); VIEWEG HELMUT (DE); WIKST) 18 August 1994 (1994-08-18) cited in the application claims 1,2,10; tables 1,2	1-9, 14-16,18
A		11-13
	-/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "A" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

9 February 2000

Date of mailing of the international search report

25.02.00

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3018

Authorized officer

Herrera, S

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat. Application No

PCT/EP 99/05145

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	EP 0 183 271 A (OKAMOTO SHOSUKE ;SHOWA DENKO KK (JP)) 4 June 1986 (1986-06-04) page 56, line 14-22; table V ---	1-9, 14-16,18
Y	DE 30 35 086 A (NIPPON CHEMIPHAR CO) 9 April 1981 (1981-04-09) page 14, line 16-19; claim 1 ---	1-9, 14-16,18
Y	WO 95 17885 A (RYAN RAYMOND ;UNIV RUTGERS (US); ANDERSON STEPHEN (US)) 6 July 1995 (1995-07-06) page 5, line 2 -page 6, line 23 page 12; table 1 -----	1-9, 14-16,18

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP99/05145

**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2. ☒ Claims Nr. 10  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:  
  
See Supplemental Sheet ADDITIONAL MATTER PCT/ISA/210
  
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

See Supplemental Sheet

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**☐

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☒

No protest accompanied the payment of additional search fees.

## Continuation of Box I.2

## Claims Nr.: 10

Patent claims 10, 12 and 13 (insofar as they are dependent upon claim 10) relate to an excessively large number of possible compounds/products/device/methods, of which only a small proportion is supported by the description as defined by PCT Art. 6 and/or can be considered as disclosed in the patent application as defined by PCT Art. 5. In the present case, the patent claims lack the necessary support and the patent application lacks the necessary disclosure to such an extent that a meaningful search covering the entire range of protection sought for appears to be impossible. For this reason, the search was directed towards those parts of the patent claims that appeared to be supported or disclosed as previously defined, namely those parts referring to the applications according to the subject matter of claims 11-13 (12-13 insofar as they are dependent upon claim 11).

The applicant's attention is drawn to the fact that patent claims, or parts of patent claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (PCT Rule 66.1(e)). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective whether or not the patent claims are amended following receipt of the International Search Report (PCT Art. 19) or whether or not the applicant files new patent claims during any PCT Chapter II procedure.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/EP99/05145

PCT/ISA/210

The International Search Authority has found that this international application contains several (groups of) inventions as follows:

1. Claims: 1-9, 14-16, 18

Use of compounds of formula I in the production of an agent for the diagnosis, therapy and prevention of urokinase or urokinase receptor associated diseases

2. Claims: 10-13, 18

Use of compounds of formula II in the production of an agent for targeting lymphocytes.



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 99/05145

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9605189 A	22-02-1996	AU 3107795 A	07-03-1996
WO 9208709 A	29-05-1992	AU 8868991 A	11-06-1992
		CA 2073776 A	16-05-1992
		EP 0511347 A	04-11-1992
		JP 5503300 T	03-06-1993
		US 5518735 A	21-05-1996
WO 9418185 A	18-08-1994	AU 5878194 A	29-08-1994
		CA 2133761 A	18-08-1994
		CZ 9402459 A	18-10-1995
		EP 0635008 A	25-01-1995
		HU 68042 A	22-03-1995
		JP 7509731 T	26-10-1995
		US 5607937 A	04-03-1997
EP 0183271 A	04-06-1986	JP 61189255 A	22-08-1986
		JP 61218565 A	29-09-1986
		JP 62005945 A	12-01-1987
		JP 61130268 A	18-06-1986
DE 3035086 A	09-04-1981	JP 1475615 C	18-01-1989
		JP 56045454 A	25-04-1981
		JP 63024988 B	23-05-1988
		JP 1475635 C	18-01-1989
		JP 56092260 A	25-07-1981
		JP 63024994 B	23-05-1988
		JP 1456159 C	09-09-1988
		JP 56092261 A	25-07-1981
		JP 63001940 B	14-01-1988
		AR 227525 A	15-11-1982
		AT 375918 B	25-09-1984
		AT 470680 A	15-02-1984
		AU 541738 B	17-01-1985
		AU 6232080 A	26-03-1981
		BE 885263 A	16-01-1981
		BR 8006052 A	07-04-1981
		CA 1142943 A	15-03-1983
		CH 646687 A	14-12-1984
		DK 396880 A,B.	21-03-1981
		ES 495175 A	16-10-1981
		FR 2472561 A	03-07-1981
		GB 2058773 A,B	15-04-1981
		HU 184828 B	29-10-1984
		IN 151297 A	26-03-1983
		IN 155437 A	02-02-1985
		IT 1129264 B	04-06-1986
		MX 155236 A	09-02-1988
		NL 8005238 A	24-03-1981
		PH 17322 A	20-07-1984
		SE 460667 B	06-11-1989
		SE 8006365 A	21-03-1981
		US 4348410 A	07-09-1982
WO 9517885 A	06-07-1995	US 5550213 A	27-08-1996
		AU 1515295 A	17-07-1995

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Int. nationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/05145

## A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 A61K31/495 A61K31/445 A61K31/195 C07D295/182 A61K47/48

Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 A61K C07D

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	WO 96 05189 A (PENTAPHARM AG ;STUERZEBECHER JOERG (DE); VIEWEG HELMUT (DE); WIKST) 22. Februar 1996 (1996-02-22) Anspruch 1	1,4-9, 14-16
Y	WO 92 08709 A (PENTAPHARM AG) 29. Mai 1992 (1992-05-29) in der Anmeldung erwähnt Anspruch 1	1,4-9, 14-16
A		11-13
Y	WO 94 18185 A (PENTAPHARM AG ;STUERZEBECHER JOERG (DE); VIEWEG HELMUT (DE); WIKST) 18. August 1994 (1994-08-18) in der Anmeldung erwähnt Ansprüche 1,2,10; Tabellen 1,2	1-9, 14-16,18
A	Tabelle 2	11-13
	--- -/-	

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

\*A\* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

\*E\* Älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

\*L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

\*O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

\*P\* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

\*T\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

\*X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung: die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

\*Y\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung: die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

\*A\* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

9. Februar 2000

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

25.02.00

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Beauftragter

Herrera, S

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Int: Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/05145

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	EP 0 183 271 A (OKAMOTO SHOSUKE ;SHOWA DENKO KK (JP)) 4. Juni 1986 (1986-06-04) Seite 56, Zeile 14-22; Tabelle V	1-9, 14-16,18
Y	DE 30 35 086 A (NIPPON CHEMIPHAR CO) 9. April 1981 (1981-04-09) Seite 14, Zeile 16-19; Anspruch 1	1-9, 14-16,18
Y	WO 95 17885 A (RYAN RAYMOND ;UNIV RUTGERS (US); ANDERSON STEPHEN (US)) 6. Juli 1995 (1995-07-06) Seite 5, Zeile 2 -Seite 6, Zeile 23 Seite 12; Tabelle 1	1-9, 14-16,18

**Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)**

Gemäß Artikel 17(2)a wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☐ Ansprüche Nr.  
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
2. ☒ Ansprüche Nr. 10  
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich  
siehe Zusatzblatt WEITERE ANGABEN PCT/ISA/210
3. ☐ Ansprüche Nr.  
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

**Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)**

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

siehe Zusatzblatt

1. ☒ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchengebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☒ Die Zahlung zusätzlicher Recherchengebühren erfolgte ohne Widerspruch.

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Fortsetzung von Feld I.2

Ansprüche Nr.: 10

Die geltenden Patentansprüche 10,12 und 13 (soweit von Anspruch 10 abhängig) beziehen sich auf eine unverhältnismäßig große Zahl möglicher Verbindungen/Produkte/Vorrichtung/Verfahren, von denen sich nur ein kleiner Anteil im Sinne von Art. 6 PCT auf die Beschreibung stützen und/oder als im Sinne von Art.5 PCT in der Patentanmeldung offenbart gelten kann. Im vorliegenden Fall fehlt den Patentansprüchen die entsprechende Stütze und fehlt der Patentanmeldung die nötige Offenbarung in einem solchen Maße, daß eine sinnvolle Recherche über den gesamten erstrebten Schutzbereich unmöglich erscheint. Daher wurde die Recherche auf die Teile der Patentansprüche gerichtet, welche im o.a. Sinne als gestützt und offenbart erscheinen, nämlich die Teile betreffend, die Verwendungen gemäss dem Gegenstand der Ansprüchen 11-13 (12-13 soweit von Anspruch 11 abhängig)

Der Anmelder wird darauf hingewiesen, daß Patentansprüche, oder Teile von Patentansprüchen, auf Erfindungen, für die kein internationaler Recherchenbericht erstellt wurde, normalerweise nicht Gegenstand einer internationalen vorläufigen Prüfung sein können (Regel 66.1(e) PCT). In seiner Eigenschaft als mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde wird das EPA also in der Regel keine vorläufige Prüfung für Gegenstände durchführen, zu denen keine Recherche vorliegt. Dies gilt auch für den Fall, daß die Patentansprüche nach Erhalt des internationalen Recherchenberichtes geändert wurden (Art. 19 PCT), oder für den Fall, daß der Anmelder im Zuge des Verfahrens gemäß Kapitel II PCT neue Patentanprüche vorlegt.

**WEITERE ANGABEN**

**PCT/ISA/ 210**

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere (Gruppen von) Erfindungen enthält, nämlich:

**1. Ansprüche: 1-9,14-16,18**

Verwendung von Verbindungen der Formel I zur Herstellung eines Mittels für die Diagnostik, Therapie und Prävention von Urokinase-oder Urokinaserezeptor-assoziierten Krankheiten

**2. Ansprüche: 10-13,18**

Verwendung von Verbindungen der Formel II zur Herstellung eines Mittels für das Targeting von Lymphzellen.

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen  
PCT/EP 99/05145

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9605189 A	22-02-1996	AU 3107795 A	07-03-1996
WO 9208709 A	29-05-1992	AU 8868991 A	11-06-1992
		CA 2073776 A	16-05-1992
		EP 0511347 A	04-11-1992
		JP 5503300 T	03-06-1993
		US 5518735 A	21-05-1996
WO 9418185 A	18-08-1994	AU 5878194 A	29-08-1994
		CA 2133761 A	18-08-1994
		CZ 9402459 A	18-10-1995
		EP 0635008 A	25-01-1995
		HU 68042 A	22-03-1995
		JP 7509731 T	26-10-1995
		US 5607937 A	04-03-1997
EP 0183271 A	04-06-1986	JP 61189255 A	22-08-1986
		JP 61218565 A	29-09-1986
		JP 62005945 A	12-01-1987
		JP 61130268 A	18-06-1986
DE 3035086 A	09-04-1981	JP 1475615 C	18-01-1989
		JP 56045454 A	25-04-1981
		JP 63024988 B	23-05-1988
		JP 1475635 C	18-01-1989
		JP 56092260 A	25-07-1981
		JP 63024994 B	23-05-1988
		JP 1456159 C	09-09-1988
		JP 56092261 A	25-07-1981
		JP 63001940 B	14-01-1988
		AR 227525 A	15-11-1982
		AT 375918 B	25-09-1984
		AT 470680 A	15-02-1984
		AU 541738 B	17-01-1985
		AU 6232080 A	26-03-1981
		BE 885263 A	16-01-1981
		BR 8006052 A	07-04-1981
		CA 1142943 A	15-03-1983
		CH 646687 A	14-12-1984
		DK 396880 A, B,	21-03-1981
		ES 495175 A	16-10-1981
		FR 2472561 A	03-07-1981
		GB 2058773 A, B	15-04-1981
		HU 184828 B	29-10-1984
		IN 151297 A	26-03-1983
		IN 155437 A	02-02-1985
		IT 1129264 B	04-06-1986
		MX 155236 A	09-02-1988
		NL 8005238 A	24-03-1981
		PH 17322 A	20-07-1984
		SE 460667 B	06-11-1989
		SE 8006365 A	21-03-1981
		US 4348410 A	07-09-1982
WO 9517885 A	06-07-1995	US 5550213 A	27-08-1996
		AU 1515295 A	17-07-1995